

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08561

研究課題名(和文)多機能計測と細胞機能操作による視交叉上核の光同調メカニズムの解明

研究課題名(英文)Light entrainment mechanism in the suprachiasmatic nucleus by multi-functional optical imaging and cell function manipulation

研究代表者

榎木 亮介 (Enoki, Ryosuke)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・准教授)

研究者番号：00528341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の概日リズム中枢は、視床下部の視交叉上核に局在し、外界から光環境情報を受けて全身にリズム情報を発振し、全身の約24時間の生理機能を制御する。視交叉上核は外部入力がなくともリズムを自ら刻む「自律振動能」と、光環境に同調する「光同調能」の機能を持つ事が必須条件である。本研究課題では、光による計測と操作により光同調メカニズムを解明することを目標に研究を行った。実験では、培養視交叉上核スライスに新規光受容タンパク質を発現させ、光により細胞機能を操作することを試みた。またマウス生体内の脳深部からの光計測法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の概日時計中枢がどのように外界環境に同調する仕組みの詳細は不明である。本研究課題では光技術により神経機能を操作する方法を確立し同調メカニズムを解明することを試みた。本研究の成果は、概日時計におけるリズム発振と同調の基本メカニズムの研究に寄与するだけでなく、概日時計の乱れに起因する健康障害・疾患の病態生理の理解や、その対処法の開発のための基盤となり得るものであり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The mammalian master circadian clock is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus located in the deep brain. The SCN receives light information from the external environment, adjusts the rhythm, and sends the information throughout the body to control 24-hour physiological functions. We previously have elucidated the mechanism of autonomous oscillation at the neural circuit level by time-lapse optical imaging of the clock gene expressions and the rhythms of intracellular calcium and membrane potential in the SCN. On the other hand, the mechanisms of light entrainment are still unknown. In this research, we aimed to manipulate neural functions and elucidate the entrainment mechanisms by light. We expressed a novel photoreceptor protein from an insect in the SCN and established the method to manipulate calcium concentration by light. In addition, we established an in vivo recording method from the SCN using optical fibers photometry system or head-mounted miniscope.

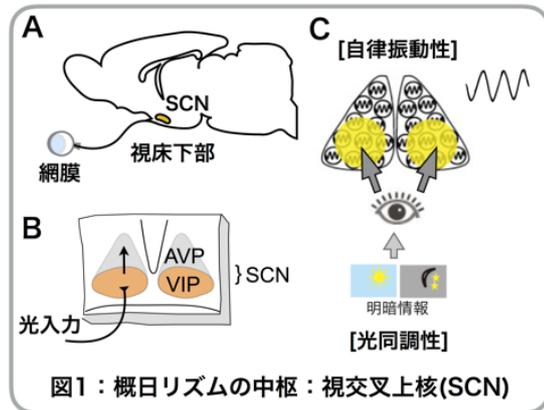
研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 光イメージング 神経細胞 視交叉上核 カルシウム 生物時計

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の概日リズムの中核は、脳深部の視床下部にある視交叉上核 (SCN) に局在し、外界環境から光を受けリズムを調整し、全身にリズム情報を発振することで、睡眠/覚醒、体温、ホルモン分泌などの約 24 時間の生理機能を制御している (図 1)。中枢時計としての視交叉上核は、外部入力がなくとも安定したリズムを自ら刻む「自律振動能」と、光環境に同調する「光同調能」の機能を持つ事が必須条件とされている。これ迄の代表者を含む長期光イメージング計測の研究により、視交叉上核における時計遺伝子の発現、細胞内カルシウムイオン濃度や膜電位の概日リズムを可視化することで、神経回路レベルでの概日リズムの自律振動の仕組みを解明してきた。一方で、光同調の仕組みの多くは未だ不明であったことから、本研究課題では特に光による神経機能の可視化と操作により、概日リズムの変化を捉えて、光同調メカニズムを解明することを目標に研究計画を立案した。

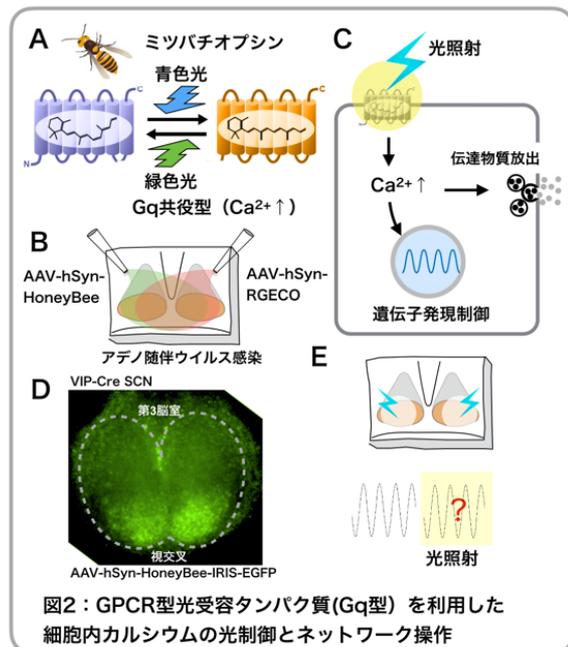


2. 研究の目的

動物個体での視交叉上核の神経回路は、網膜より刻々と外界からの光入力を受けて、情報を選択して出力を決定し、最終的に自身の概日リズムを外界環境に同調させる。しかしながら、自律振動する視交叉上核がどのようにして外界の光情報を受け、情報を統合し、最終的に出力を決定しているのかは、そのメカニズムの多くは不明である。研究が遅れている原因の一つは、視交叉上核の細胞機能を自在に操作する技術基盤が確立しておらず、網膜光入力の際の神経回路の活動を捉える事が出来ないこと考えた。本研究では、視交叉上核の神経回路の可視化技術に加え、細胞機能を操作する技術を確立し、環境情報入力を培養スライス上で再現することで、視交叉上核の神経回路での光応答性および情報選択の仕組みを解明することを目的とした。

これまでの研究により、視交叉上核神経細胞ネットワークには細胞内カルシウム濃度の概日リズム (概日カルシウムリズム) が見いだされ、薬理実験により、概日カルシウムリズムへの活動電位発生による寄与は小さく、細胞内カルシウムストアによる制御が報告されていた。本研究では GPCR 型光受容タンパク質を利用して、カルシウムストアを制御して細胞内カルシウムリズムを制御することを試みた。

動物個体レベルでは、光照射の時刻に依存して概日リズムの位相が前進または後退する。特に昼間の時間帯には光入力を遮断する仕組み (ゲート機構) が備わっており、この時間帯での光照

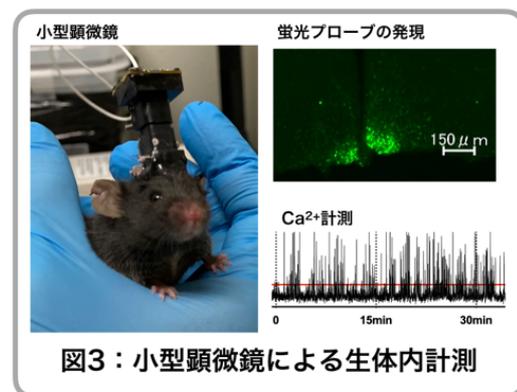


射は無効となる。ゲート機構は分散培養細胞では確認できず、個体レベルで出現する現象であることから、神経回路レベルで達成されると推察された。自在な光操作が可能となれば、様々なリズム位相で行うことで、視交叉上核の神経回路レベルでのゲート機構とその仕組みを解析することが可能となると考えた。

3. 研究の方法

培養視交叉上核スライスの主たる光受容領域にある VIP 細胞群に、新規光受容タンパク質を発現させて、光により細胞機能を操作することを試みた。特に昆虫（ミツバチ）から得られた光駆動型オプシン（GPCR）の遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスを作成し、VIP-Cre マウス由来の視交叉上核スライスに発現させた（図2）。ニポウディスク共焦点と高感度 CCD カメラからなる長期タイムラプス顕微鏡システムを用いて、視交叉上核の神経細胞のカルシウム応答や時計遺伝子発現の変化を観察する。

また *in vitro* 実験と並行して、マウス生体内での解析を可能とするため、脳深部からの長期光計測法の確立を行った。成獣マウスの脳深部局所へアデノ随伴ウイルスを感染させ、遺伝子コード型蛍光プローブを発現させ、光ファイバーフォトメトリーシステムおよび小型顕微鏡により脳深部活動を計測した（図3）。小型顕微鏡は UCLA が公開している作成プロトコルを用いて作成した。光計測と同時に動物行動を計測するため、赤外線センサーおよび腹部埋め込みセンサーによる計測方法を確立した。



4. 研究成果

新規光受容タンパク質を、網膜投射領域の選択的に発現させることを可能とした。細胞内カルシウム濃度を光で制御し、光入力を生体に相似した条件で再現する実験系を確立した。また生体内の脳深部からの光計測法を確立し、動物行動との関連とともに計測することを可能とした。一連の研究により、培養スライスから生体動物における概日リズムの振動メカニズムと同調メカニズムを評価する実験系を確立することが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maejima Takashi, Tsuno Yusuke, Miyazaki Shota, Tsuneoka Yousuke, Hasegawa Emi, Islam Md Tarikul, Enoki Ryosuke, Nakamura Takahiro J., Mieda Michihiro	4. 巻 118
2. 論文標題 GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 xx
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2010168118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirata Yoshihiro, Enoki Ryosuke, Kuribayashi-Shigetomi Kaori, Oda Yoshiaki, Honma Sato, Honma Ken-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Circadian rhythms in Per1, PER2 and Ca2+ of a solitary SCN neuron cultured on a microisland	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54654-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wu Yu-Er, Enoki Ryosuke, Oda Yoshiaki, Huang Zhi-Li, Honma Ken-ichi, Honma Sato	4. 巻 115
2. 論文標題 Ultradian calcium rhythms in the paraventricular nucleus and subparaventricular zone in the hypothalamus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E9469 ~ E9478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1804300115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ono Daisuke, Honma Sato, Nakajima Yoshihiro, Kuroda Shigeru, Enoki Ryosuke, Honma Ken-ichi	4. 巻 114
2. 論文標題 Dissociation of Per1 and Bmal1 circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E3699 ~ E3708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1613374114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kon Shunsuke, Ryosuke Enoki (29人中22番目)	4. 巻 19
2. 論文標題 Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 530 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncb3509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Enoki Ryosuke, Oda Yoshiaki, Mieda Michihiro, Ono Daisuke, Honma Sato, Honma Ken-ichi	4. 巻 114
2. 論文標題 Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E2476 ~ E2485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1616815114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Enoki Ryosuke, Ono Daisuke, Kuroda Shigeru, Honma Sato, Honma Ken-ichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 41733 ~ 41733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep41733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計38件 (うち招待講演 17件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 Visualizing Neuronal Circuits Controlling Circadian and Ultradian Ca ²⁺ Rhythms in Mammals
3. 学会等名 第10回 生理研 霊長研 新潟脳研 合同シンポジウム, Zoom開催(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣蒼太, 根本知己, 榎木亮介
2. 発表標題 概日時計中枢における核-細胞質カルシウム動態の長期イメージング解析
3. 学会等名 第29回日本バイオイメーjing学会学術集会, Zoom開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎木亮介, 廣蒼太, 根本知己
2. 発表標題 光イメージング計測で紐解く生物時計中枢神経回路の作動原理
3. 学会等名 第10回名大生理研合同シンポジウム, 生理研-名古屋大学, Zoom開催 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎木亮介, 廣蒼太, 根本知己
2. 発表標題 多機能イメージング計測から迫る概日リズム中枢神経回路の作動原理
3. 学会等名 細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線, 生理学研究所, Zoom開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣蒼太, 山田淑子, 舘野高, 根本知己, 榎木亮介
2. 発表標題 概日時計中枢における核-細胞質のCa ²⁺ 動態の光イメージング解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 (大分)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 時を刻む脳～生物時計中枢を司る神経回路の光イメージング解析～
3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学（岡崎カンファレンスセンター）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 光計測で紐解く生物時計中枢神経回路の作動原理
3. 学会等名 運動・行動から紐解く脳神経回路発達メカニズムの異分野融合研究による解明（生理学研究所、岡崎）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 ～時を刻む脳～ 生物時計中枢を司る 神経回路の光イメージング解析～
3. 学会等名 第3回医・理・工連携みらい会議（愛知県蒲郡市）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 Imaging Neuronal Network Controlling Circadian and Ultradian Calcium Rhythms in Mammals
3. 学会等名 第2回 ExCELLSシンポジウム（岡崎カンファレンスセンター）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 概日/超短カルシウムリズムを制御する神経回路の可視化解析
3. 学会等名 日本時間生物学会（金沢大学）、シンポジウム「生物の多様な集団発振現象（共催：新学術領域研究オシロロジー）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 “光”で探る生物時計中枢の作動メカニズムの探求
3. 学会等名 自然科学研究機構ExCELLs公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 Visualizing Neuronal Circuits Controlling Circadian and Ultradian Rhythms in Mammals
3. 学会等名 International Meeting for Young Researchers（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Hirata, Ryosuke Enoki, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Yoshiaki Oda, Sato Honma, Ken-ichi Honma
2. 発表標題 Optical imaging of circadian calcium rhythm in a solitary suprachiasmatic neuron
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会（FAOPS2019）（神戸）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 生物時計中枢の光イメージング解析
3. 学会等名 ニコン顕微鏡イメージングフォーラム（品川，東京）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 時を刻む脳 ~ 生物時計中枢を司る神経回路の光イメージング解析 ~
3. 学会等名 生理学研究所、所長招聘セミナー（岡崎市、愛知県）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Hirata, Ryosuke Enoki, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Yoshiaki Oda, Sato Honma, Ken-ichi Honma
2. 発表標題 Optical imaging of circadian calcium rhythm in a solitary suprachiasmatic neuron
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会（FAOPS2019）（神戸、兵庫県）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryosuke Enoki, Yu-Er Wu, Yoshiaki Oda, Zhi-Li Huang, Ken-ichi Honma, Sato Honma
2. 発表標題 Ultradian Calcium Rhythms in the PVN and SPZ in the Hypothalamus
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会（FAOPS2019）（神戸、兵庫県）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 生物時計中枢の光イメージング解析
3. 学会等名 ニコン顕微鏡イメージングフォーラム（品川，東京）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 生物時計中枢を司る神経回路の光イメージング解析
3. 学会等名 北海道大学電子科学研究所・研究交流会（北海道、札幌）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 時を刻む脳 ~ 生物時計中枢における神経回路の光イメージング解析 ~
3. 学会等名 生理学会北海道地方会総会（北海道、札幌）（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 視床下部の室傍核及び傍室傍核領域におけるウルトラディアンカルシウムリズム
3. 学会等名 アライアンスG3分科会（東京工業大学）（町田、東京）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 平田快洋、榎木亮介、繁富(栗林)香織、織田義晃、本間さと、本間研一
2. 発表標題 マイクロパターン基板を用いた視交叉上核単一ニューロンの概日振動解析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 38 回研究会 CHEMINAS 38th (札幌市交流プラザ) (北海道、札幌)
4. 発表年 2018年~2019年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 Illuminating Neuronal Circuits Controlling Circadian and Ultradian Rhythms in Mammals
3. 学会等名 International Meeting on Bioimaging for Young Researchers, Chanpuru, OIST (恩納村、沖縄) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 織田善晃、榎木亮介、高須奈々、中村渉、本間研一、本間さと
2. 発表標題 高速蛍光イメージングを用いた概日時計中枢神経細胞の概日Ca ²⁺ リズム形成機構の解析
3. 学会等名 西日本生理学会 (北九州国際会議場) (北九州、福岡)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 時を刻む脳 ~生物時計中枢神経回路の光イメージング解析~
3. 学会等名 金沢大学統合神経生理学セミナー (金沢、石川県) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 Ultradian Calcium Rhythms in the Paraventricular Nucleus and Subparaventricular Zone in the Hypothalamus
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythms (Sapporo, Hokkaido) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 生物時計の光イメージングで生きる道(ニッチ)を探る
3. 学会等名 細胞構成研究会2018(北海道大学)(札幌、北海道)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 視床下部ウルトラディアンカルシウムリズムの発生機序
3. 学会等名 NanoBio 第11回若手ネットワーキングシンポジウム(北海道大学)(札幌、北海道)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 生物時計中枢を司る神経細胞ネットワークの可視化解析
3. 学会等名 第8回物質・デバイス領域共同研究拠点活動報告会及び平成29年度ダイナミック・アライアンス成果報告会(北海道大学)(札幌、北海道)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 室傍核ウルトラディアンリズムの発生機序
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会、サンポートホール高松（香川）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Enoki R
2. 発表標題 Illuminating neuronal circuits governing circadian and ultradian rhythms in mammals
3. 学会等名 The Fourth National Academic Conference of Sleep, Chronobiology and Neuropsychopharmacology, Fudan University (Shanghai) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 時を刻む脳:概日リズム中枢の光イメージング解析
3. 学会等名 レーザーバイオ医療技術専門委員会、北海道大学（札幌）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Enoki R, Oda Y, Mieda M, Ono D, Honma S, Honma K
2. 発表標題 Coherent Circadian Voltage Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus
3. 学会等名 Gordon Conference, Stoweflake Conference Center, Stowe, VT, USA. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ono D, Enoki R, Honma K, Honma S
2. 発表標題 Simultaneous measurement of circadian rhythms of multiple functions: dissociation of PER1 and Bmal1 circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus
3. 学会等名 european biological rhythms society congress, Amsterdam, Nederland (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平田快洋, 榎木亮介, 繁富(栗林)香織, 織田善晃, 本間さと, 本間研一
2. 発表標題 マウス視交叉上核の単一神経細胞における概日性 Ca ²⁺ 振動と神経-グリア間相互作用
3. 学会等名 日本時間生物学会学術大会、京都大学(京都)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 織田善晃, 榎木亮介, 本間研一, 本間さと
2. 発表標題 視交叉上核神経細胞の概日Ca ²⁺ リズムは Ca ²⁺ の静止濃度の変動による
3. 学会等名 日本時間生物学会学術大会、京都大学(京都)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Oda Y, Enoki R, Honma K, Honma S
2. 発表標題 Understanding Circadian Calcium rhythms by fast Calcium imaging techniques
3. 学会等名 Gordon Conference, Stoweflake Conference Center, Stowe, VT, USA. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wu Y, Enoki R, Oda Y, Honma K, Huang ZL, Honma S
2. 発表標題 Ultradian Ca2+ Rhythms in the Paraventricular Hypothalamic Nucleus
3. 学会等名 日本時間生物学会学術大会、京都大学（京都）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 榎木亮介	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 58
3. 書名 月刊「細胞」	

1. 著者名 榎木亮介	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 9
3. 書名 Annual Review 神経 2020	

〔産業財産権〕

〔その他〕

個人Webサイト https://www.enokiryosuke.com researchmap https://researchmap.jp/enoki

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	織田 善晃 (Oda Yoshiaki) (20735542)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	復旦大学			